Münster 1936 No 46 Med DiSS

Aus dem Pharmakologischen
Institut der Westf. Wilhelms-Universität, Münster (Westf.)
(Direktor Prof. Dr. H. Freund.)

Ueber die pharmakologische Wirkung v. Pankreasextrakten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde der hohen medizinischen Fakultät der Westf. Wilhelms-Universität zu Münster (Westf.)

vorgelegt von

Alfons Dalhoff
Zahnarzt

aus Borghorst (Westf.)

1935

Buchdruckerei Josef Fehmer, Borghorst (Westf.)

Dekan: Professor Dr. Klinge.

Referent: Professor Dr. Freund.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster (Westf.)

Die Entdeckung des Kallikreins durch Frey und Kraut [1]) hat dem Pankreas als Bildungsstätte für körpereigene Wirkstoffe eine gewisse Sonderstellung verliehen. Zahlreiche Arbeiten der genannten Autoren haben das Auftreten und Verschwinden der Kallikreinwirkung in vielen Einzelheiten geklärt und zur Einreihung des Kallikreins unter die wahrscheinlich physiologisch wichtigen Wirkstoffe geführt. Ueber andere pankreaseigene Stoffe — adenosinartige, cholinähnliche und histaminähnliche Substanzen — liegen dagegen nur lückenhafte Befunde vor. Die Entstehungsbedingungen dieser Stoffe wurden deshalb näher untersucht.

Methodik.

Frisches Hunde- oder Rinderpankreas oder ein daraus hergestelltes Acetontrockenpräparat wurden zu verschiedenen Extrakten verarbeitet und pharmakologisch auf kreislauf-, darm- und uteruswirksame Stoffe untersucht. Die Abgrenzung histammähnlicher Stoffe geschah im Blutdruckversuch am Kaninchen in tiefer Aethernarkose, am isolierten Kaninchendünndarm und durch Wahl geeigneter chemischer Trennungsmethoden. Cholinähnliche Stoffe wurden durch das Verhalten gegenüber Atropin erkannt. Adenosinartige Stoffe wurden in der üblichen Weise am Blutdruck des atropinisierten Kaninchens und am Kaninchendünndarm nachgewiesen. Durch Säurehydrolyse ließen sich die Substanzen inaktivieren. Eine durch Kallikrein hervorgerufene Blutdrucksenkung konnte durch Kochen der Lösung ausgeschaltet werden.

1. Wirkung frischer Pankreasextrakte.

Untersucht wurden Press-Säfte, Kochsäfte, Trichloressigsäurefiltrate (Tr.-Filtrat) und Alkoholextrakte aus lebensfrischem und lebensfrisch mit Aceton getrocknetem Hunde- und Rinderpankreas.

Bei der Herstellung des Press-Saftes wurde nur lebensfrisches Pankreasgewebe mit physiologischer Kochsalzlösung oder n/50 Essigsäure im Mörser zerrieben. Das neutrale Filtrat wurde sofort pharmakologisch untersucht.

---

[1]) E. K. Frey u. H. Kraut, Ztschr. physiol. Chem. **157,** 32, (1926).
Dieselben, Arch. exp. Pathol. **158,** 334 (1930).
Dieselben, u. E. Bauer, Ztschr. physiol. Chem. **175, 97,** (1928).
Dieselben u. E. Werle, ebenda **189,** 97, (1930) — **192,** 1 (1930) **222,** 73, (1933).
Dieselben, E. Bauer u. F. Schulz. ebenda **205,** 99, (1932).

Schon in kleinen Mengen senkten die frischen Press-Säfte den Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose sehr stark und bewirkten am isolierten Kaninchendarm reine Hemmung, am Uterus Erregung. Atropinvorbehandlung schwächte die Blutdrucksenkung etwas ab. 15 Minuten langes Erhitzen im siedenden Wasserbad bei neutraler Reaktion änderte praktisch nichts an der Wirkung. Nach zweistündiger Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure trat am Blutdruck noch eine leichte Senkung oder keine Wirkung, am isolierten Darm eine Erregung auf. Beide Wirkungen konnten durch Atropin ausgeschaltet werden. Die erhobenen Befunde sind zu deuten als Mischwirkung von adenosinartigen und cholinähnlichen Stoffen. Die Hauptwirkung kommt den ersteren zu. Kallikrein war nicht nachweisbar.

In größeren Gaben waren frische Press-Säfte stark toxisch und zeigten die von Freund [2]) beschriebene „Frühgiftwirkung". Nach kurzem Stehen nahm die Giftigkeit ab. Die blutdrucksenkende und darmhemmende, also adenosinartige Wirkung blieb längere Zeit bestehen. Sie ist, wie Zipf [3]) gezeigt hat und wie neuerdings auch Karhiwabara [4]) betont hat, nur eine Teilkomponente der „Frühgiftwirkung". An letzterer sind wahrscheinlich auch höher molekulare Eiweiß-Spaltlinge beteiligt.

Pankreassäfte wurden durch kurzes Aufkochen von zerkleinertem frischen Pankreasgewebe oder von Pankreastrockenpulver mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit n/50 Essigsäure hergestellt. Die pharmakologische Untersuchung der neutralen Kochfiltrate ergab, verglichen mit den Press-Säften, eine geringere Toxizität. Im übrigen stimmte die Wirkung der beiden vollkommen überein.

Die Tr.-Filtrate wurden in der von Zipf [5]) angegebenen Weise hergestellt. Sie zeigten blutdrucksenkende, uteruserregende und darmhemmende Wirkung, welche durch Atropinvorbehandlung praktisch nicht beeinflußt wurden und durch zweistündige Hydrolyse vollkommen oder fast vollkommen aufgehoben wurde. In manchen Fällen konnte ein Teil der blutdrucksenkenden Wirkung durch Atropin aufgehoben werden.

---

[2]) H. Freund, Arch. exp. Pathol. **88,** 39, (1920).

[3]) K. Zipf, Arch. exp. Pathol. **157,** 95, (1930).

[4]) Karhiwabara, I. of orient. med. **21,** 4, (1934) — Ber. ges. Physiol. **82,** 682, (1935).

[5]) K. Zipf, Arch. exp. Pathol. **160,** 579, (1931).

Die alkoholische Extraktion nach dem Verfahren von Best, Dale, Dudley und Thorpe [6]) diente vor allem dem Nachweis cholin- und histaminähnlicher Stoffe.

Zerkleinertes frisches Pankreasgewebe oder Pankreastrockenpulver wurden 24 Stunden lang mit etwa 70%igem Alkohol extrahiert. Das mit Schwefelsäure (4 ccm 20%ige Schwefelsäure auf 1000 ccm Filtrat) angesäuerte Filtrat wurde 24 Stunden im Eisschrank gehalten, erneut filtriert, neutralisiert und im Vakuum bei 40—50° C auf ein möglichst kleines Volumen eingeengt. Aus der wässrigen Lösung wurde durch Zusatz von absolutem Alkohol eine 80%ige alkoholische Lösung hergestellt, welche durch drei Volumenteile Aceton gefällt wurde. Die Acetonfällung enthält nach den oben genannten Autoren 70% der blutdrucksenkenden Gewebsstoffe. Histamin und nach Zipf [7]) vor allem auch adenosinartige Stoffe gehen in die Fällung über.

Die „Acetonfällung" senkte den Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose stark und bewirkte am isolierten Kaninchendarm starke Hemmung, manchmal mit nachfolgender Erregung. Am isolierten Uterus trat Erregung auf. Atropinvorbehandlung schwächte die Blutdruckwirkung etwa um 30% ab. Durch zweistündige Säurehydrolyse wurde die Blutdrucksenkung erheblich abgeschwächt. Am atropinvorbehandelten Tier war nur eine geringe oder keine depressorische Wirkung feststellbar. Die darmhemmende Wirkung wurde durch Säurehydrolyse nahezu vollkommen aufgehoben, die darmerregende Wirkung verstärkt. Letztere konnte durch Atropin ausgeschaltet werden.

2. Wirkung von Extrakten aus gealtertem Pankreasgewebe.

Zur Herstellung von Extrakten aus gealtertem Pankreas dienten frisches zerkleinertes Gewebe oder fein zermahlenes Acetonpräparat. Mit physiologischer Kochsalzlösung oder n/50 Essigsäure wurde das Ausgangsmaterial 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend auf einfache wässrige Auszüge, Kochsäfte, Tr.-Filtrate und Alkoholextrakte verarbeitet. Zur Hemmung des Bakterienwachstums wurde, wo angängig, Toluol zugesetzt.

Das neutrale Filtrat des einfachen wässrigen Auszuges — mit physiologischer Kochsalzlösung oder n/50 Essigsäure — wirkte nach

[6]) C. H. Best, H. H. Dale, H. W. Dudley und W. V. Thorpe, Journ. of physiol. **62**, 397, (1927).

[7]) K. Zipf, Arch. exp. Pathol. **160**, 579, (1931).

24 Stunden am Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose stark blutdrucksenkend. Atropin schwächte die Wirkung kaum ab. Der isolierte Kaninchendünndarm wurde gehemmt.

Nach 20—24 stündiger Dialyse (Dialysierhülsen von Schleicher und Schüll) gegen fließendes aq. dest. oder physiologische Kochsalzlösung war noch eine starke depressorische Wirkung festzustellen. Die darmhemmende Wirkung war stark abgeschwächt.

Durch Erhitzen — 10 Minuten im siedenden Wasserbad — des wässrigen Auszuges oder Dialysates wurde die depressorische Wirkung nahezu vollkommen aufgehoben.

Der gealterte wässrige Extrakt aus Pankreas enthält demnach eine nicht dialysable und nicht hitzebeständige depressorische Substanz, die nach ihrem Verhalten dem Kallikrein entspricht. Daneben kommen in geringerer Menge adenosinartige Stoffe, noch weniger cholinähnliche Substanzen, aber keine histaminähnlichen Körper vor. Verglichen mit dem frischen Pankreasauszug trat durch das Altern eine starke Abnahme der adenosinartigen Stoffe ein. Nach Zipf [8]) verschwinden adenosinartige Stoffe in Organpress-Säften sehr rasch durch fermentativen Abbau. Andererseits ist im frischen wässrigen Auszug aus lebensfrischem Pankreas und Trockenpräparat kein Kallikrein nachweisbar.

Da nach Kraut, Frey und Werle [9]) Aceton-Aetherbehandlung den Inaktivator des Kallikreins zerstört, so ist das Fehlen von Kallikrein im frischen wässrigen Auszug und sein Auftreten im gealterten Pankreasextrakt vielleicht zu erklären durch schlechte Extrahierbarkeit oder postmortale fermentative Entstehung. Letztere wäre durchaus möglich, da bei der für Kallikrein angegebenen Extraktionsverfahren die pankreaseigenen Fermente intakt bleiben. Für die Frage der physiologischen Bedeutung des Kallikreins wäre eine Klärung der Sachlage von größter Wichtigkeit.

Wurde bei der Herstellung wässriger Pankreasextrakte vom getrocknetem Pankreasgewebe ausgegangen, so konnte nach 24 stündigem Stehen ebenfalls eine starke depressorische und darmhemmende Wirkung festgestellt werden. Durch Atropinvorbehandlung trat nur eine leichte Abschwächung der blutdrucksenkenden Wirkung ein. Nachträgliches Erhitzen des wässrigen Auszuges beeinflußte die Wirkung nicht.

---

[8]) K. Zipf, Klin. Wo. **1931**, 1521.

[9]) H. Kraut, E. K. Frey u. E. Werle, Ztschr. phys. Chemie **222**, 73, (1933).

Diese Wirkung beruht auf dem Gehalt an adenosinartigen Stoffen, welche durch Erhitzen des Pankreasgewebe vor der fermentativen Zerstörung geschützt wurden. Dazu kommen kleine Mengen cholinähnlicher Substanzen, dagegen kein Histamin. Kallikrein mußte wegen seiner Hitzeempfindlichkeit in solchen Extrakten fehlen.

Kochsäfte aus nicht erhitztem Pankreas zeigten abgeschwächte Adenosin- und geringe Cholinwirkung. Histamin war nicht nachweisbar, Kallikrein war durch das Kochen zerstört.

Dieselbe Wirkung hatten Tr.-Filtrate. Sie enthielten adenosinartige Stoffe, geringe Mengen cholinähnlicher Substanzen, aber keine histaminähnlichen Körper. Kallikrein war bei dem gewählten Darstellungsverfahren nicht zu erwarten.

Auch die Acetonfällung wirkte adenosinartig und cholinähnlich. Der Gehalt an cholinähnlichen Stoffen war etwas größer als bei den anderen Extrakten. Die Acetonfällung enthielt kein Histamin.

3. Wirkung von Trypsin, Pankreatin und Papain auf die Bildung von Pankreaswirkstoffen.

Das Fehlen der Kallikreinwirkung in frischem Pankreassaft, die Bildung des Kallikreins beim Stehen in fermenthaltiger wässriger Lösung und die Abnahme der adenosinartigen Stoffe unter denselben Bedingungen gaben Veranlassung, die Bildung von Pankreaswirkstoffen unter dem Einfluß von Trypsin, Pankreatin und Papain zu untersuchen.

Zum Studium der Trypsinwirkung wurde folgender Ansatz gewählt: 5 g Pankreastrockenpulver oder 10 g frisches zerkleinertes Pankreas wurden mit 50 ccm aq. dest., 0,5 g Natriumkarbonat, 0,1 g Trypsin, und 1 ccm Toluol versetzt. Nach 19 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde mit Essigsäure angesäuert und abgenutscht. Filtrat wurde in zwei Teile geteilt, von denen der erste Teil 24 Stunden gegen fließende physiologische Kochsalzlösung dialysiert, der zweite Teil zu den oben erwähnten Extrakten verarbeitet wurde.

Das Dialysat zeigte starke depressorische Wirkung, die durch Erhitzen — 10 Minuten in siedendem Wasserbad — um etwa ein Drittel abgeschwächt wurde. Der hitzeresistente Teil der depressorischen Wirkung war atropinfest. Am isolierten Kaninchendünndarm wirkten gekochtes und ungekochtes Dialysat hemmend.

Das Tr.-Filtrat aus trypsinverdautem Pankreas hatte nur Adenosinwirkung. In der Acetonfällung waren außerdem noch kleine Mengen

cholinähnlicher Stoffe enthalten. In beiden Extrakten fehlte, wie zu erwarten, das Kallikrein.

Wurde das Pankreasgewebe nach Zusatz von aq. dest. zur Vernichtung von pankreaseigenen Fermenten und präformierten Kallikrein 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend mit Trypsin verdaut, so war im Dialysat kein Kallikrein nachweisbar.

Die Wirkung der übrigen Extrakte — Koch- und T.-Filtrat, Acetonfällung — war die gleiche. Sie enthielten adenosinartige und cholinähnliche Stoffe.

Der Einfluß des Pankreatins wurde in ähnlicher Anordnung wie beim Trypsin untersucht: Die Zusammensetzung des Ansatzes war die gleiche. Statt des Trypsins wurde 0,1 g Pankreatin zugesetzt. Die Ansätze blieben 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wurden nach Ansäuern mit Essigsäure abgenutscht. Das Filtrat wurde in der oben beschriebenen Weise weiter verarbeitet.

Das Dialysat enthielt keine nachweisbaren Mengen von Kallikrein. Kochen des Dialysates veränderte seine depressorische und stark darmhemmende Wirkung nicht. Durch Säurezusatz wurde kein Kallikrein aus einer etwa inaktiven Form freigemacht.

Es muß deshalb angenommen werden, daß Pankreatin präformiertes Kallikrein schädigt oder die Neubildung hemmt.

Das Dialysat enthielt, da eine vollständige Trennung von dialysablen und nicht dialysablen Stoffen nicht durchgeführt wurde, ähnlich wie beim Trypsinversuch, noch adenosinartige Stoffe, aber kein Histamin.

Der einfache Kochsaft, das Tr.-Filtrat und die Acetonfällung enthielten ebenfalls adenosinartige Stoffe. Das Tr.- Filtrat und vor allem die Acetonfällung hatten daneben noch eine cholinähnliche Wirkung, die durch Atropin ausgeschaltet werden konnte. Histaminähnliche Stoffe waren in keinem der Extrakte nachweisbar.

Verdauungsversuche mit Pankreatin an vorher getrocknetem Pankreas ergaben dieselben Befunde. Der Gehalt an adenosinartigen Stoffen war gegenüber den Versuchen mit frischem Pankreas etwas größer. Wie oben erwähnt, nimmt der Gehalt an adenosinartigen Stoffen bei längerem Stehen infolge fermentativen Abbaues stark ab. Dasselbe wurde auch bei den Trypsinversuchen beobachtet.

Außer Trypsin und Pankreatin wurde das proteolytische Ferment Papain zu Verdauungsversuchen verwendet. Kraut, Frey und

B a u e r [10]) haben dieses Ferment direkt zur Freilegung von Kallikrein aus Blut und Gewebe empfohlen. Die Versuchsanordnung war eine ähnliche wie bei den Trypsin- und Pankreatinversuchen: 10 g frisches zerkleinertes Pankreasgewebe oder 5 g Pankreastrockenpulver wurden mit 40 ccm aq. dest., 10 ccm n/10 Acetatpuffer (ph 5), 0,2 g Papain und 1 ccm Toluol versetzt. Nach 22 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde abgenutscht. Das Filtrat wurde in der oben beschriebenen Weise weiterverarbeitet.

Das Dialysat enthielt einen blutdrucksenkenden, nicht dialysablen und hitzelabilen Stoff, also Kallikrein.

Durch Papainverdauung von gekochtem Pankreas — (Inaktivierung von pankreaseignen Fermenten und präformiertem Kallikrein) — entstand kein Kallikrein.

Im Kochsaft, Tr.-Filtrat und in der Acetonfällung wurden vor allem adenosinartige Stoffe gefunden. Histamin oder histaminähnliche Substanzen waren nicht nachweisbar.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Press-Säfte aus frischem Pankreasgewebe enthalten neben kleinen Mengen von cholinähnlichen Substanzen vor allem adenosinartige Stoffe, dagegen kein Histamin oder histaminähnliche Stoffe. Kallikrein ist darin in aktiver Form nicht nachweisbar. Frische Pankreaspress-Säfte zeigen typische „Frühgiftwirkung".

2. In Kochsäften und Tr.-Filtraten aus frischem Pankreas sind meist neben geringen Mengen cholinähnlicher Substanzen reichlich adenosinartige Stoffe nachweisbar.

3. Die Acetonfällung aus frischem Pankreas zeigt adenosinartige und cholinähnliche Wirkungen. Histamin ist darin nicht nachweisbar.

4. Nach längerem Stehen von Pankreasgewebe in physiologischer Kochsalzlösung oder n/50 Essigsäure können im neutralen Filtrat Kallikrein, adenosinartige Stoffe und cholinähnliche Stoffe, dagegen kein Histamin nachgewiesen werden.

5. Der Gehalt des Pankreas an adenosinartigen Stoffen nimmt beim Altern infolge fermentativer Zerstörung ab.

6. Nach Verdauung von frischem Pankreasgewebe mit Trypsin oder Papain tritt Kallikreinwirkung auf.

7. Nach Pankreatinverdauung ist kein Kallikrein nachweisbar.

8. Aus ferment- und kallikreinfreiem Pankreasgewebe entsteht durch Trypsin-, Pankreatin- oder Papainverdauung kein Kallikrein.

9. Kochfiltrate, Tr.-Filtrate und Acetonfällungen zeigen nach Verdauung von Pankreasgewebe mit Trypsin, Pankreatin oder Papain adenosinartige und cholinähnliche, aber keine histaminähnlichen Wirkungen.

Lebenslauf.

Am 26. Februar 1908 wurde ich, Paul Alfons Dalhoff, zu Münster in Westfalen geboren. Nach vierjährigem Unterricht in der Volksschule zu Borghorst i. W. besuchte ich 5 Jahre die Rektoratschule daselbst und bestand die Prüfung für Untersekunda. Von 1923 bis Ostern 1928 war ich auf dem Staatlichen Paulinischen Gymnasium in Münster, wo ich das Reifezeugnis erhielt. Im Sommer-Semester 1928 begann ich das medizinische Studium in Münster, das ich im Winter-Semester 1931/32 mit dem zahnmedizinischen wechselte. Am Ende des Winter-Semesters 1932/33 bestand ich in Münster meine zahnärztliche Vorprüfung und am 30. November 1934 mein Staatsexamen mit „sehr gut."